

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003408

International filing date: 23 February 2005 (23.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-045658  
Filing date: 23 February 2004 (23.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 2 3 日

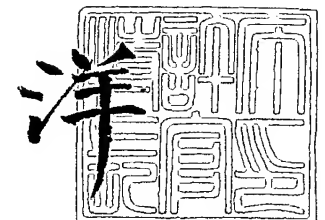
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 4 5 6 5 8  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 4 - 0 4 5 6 5 8 ]

出 願 人  
Applicant(s): 独 立 行 政 法 人 産 業 技 術 総 合 研 究 所

2 0 0 5 年 3 月 3 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 2004000885  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 6/00  
C12N 5/00

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内  
【氏名】 植村 壽公

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内  
【氏名】 斉藤 隆史

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
つくばセンター内  
【氏名】 藤井 健男

【特許出願人】  
【識別番号】 301021533  
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
【代表者】 吉川 弘之  
【電話番号】 029-861-3280

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髄細胞を培養することを特徴とする、象牙質の再生方法。

**【請求項 2】**

前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質が、フォスフォフォリン、フォスビチンまたはDMP-1、あるいはそれらの混合物である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質がコラーゲンに化学架橋されていることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記複合材料が、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料である、請求項 1 または 2 記載の方法。

**【請求項 5】**

増殖因子を添加して培養を行うことを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記増殖因子が骨形成因子(BMP)である、請求項 5 記載の方法。

**【請求項 7】**

前記コラーゲンがコラーゲンタイプ I である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

さらに、前記複合材料が、ハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP,  $\alpha$ -TCP, ポログリコール酸およびポリ乳酸から選ばれる少なくとも 1 以上を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法によって再生された象牙質を前記複合材料とともに含む、象牙質修復用材料。

**【請求項 10】**

非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋後、凍結乾燥あるいは加熱ゲル化して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料からなる象牙質修復用材料。

**【請求項 11】**

さらに歯髄細胞を含む、請求項 10 記載の象牙質修復用材料。

【書類名】明細書

【発明の名称】象牙質再生方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、象牙質の再生方法とその他の複合材料に関する。より詳しくは、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料と、これを利用した象牙質の再生方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、歯科領域における象牙質の修復には、人工材料の移植が行われることが多い。こうした人工材料には、生体材料としての生体適合性に加えて、石灰化誘導性—すなわち、移植後、石灰質を誘導しつつ、材料自らは吸収される性質—が求められる。

【0003】

象牙質再生用材料としては、セラミックス系材料などが考案されているが、石灰化誘導能の点からは、BMP(bone morphogenic protein)とコラーゲンとの複合材料のほうが有力と考えられており、これ以外に十分な石灰化能が期待できる材料はない。しかし、BMPは強い石灰化能を有するが、水に溶解しにくいこと、最適な担体が見出されていないこと、マウス、ラットなどの小動物では高い石灰化能が認められても、ヒトへの臨床応用では0.4mg/ml程度の高濃度を必要とすることから、現状では高額医療に利用が限定されると予想される。したがって、BMPに代る、安全かつ安価な、石灰化能を有する生体吸収性材料の開発が望まれている。

【0004】

発明者らは、これまで、歯に含まれるフォスフォフォリンやフォスビチンが単独で骨形成能を有していることを見出しているが（非特許文献1）、これらが実際に象牙質再生に応用されたという報告はない。また、発明者らは、フォスフォフォリンをコラーゲンに架橋させた骨再生用複合生体材料について報告しているが（特許文献1）、骨再生の結果から象牙質の再生効果を予測することはできない。

【0005】

一方、象牙質再生用材料には、生体吸収性であること、歯槽骨や象牙質の歯周病や欠損部位を適切に補填するために、成形が容易でしなやかな力学的特性を有することが望まれる。これに関して、コラーゲンタイプIは、元来、歯槽骨や象牙質の主な有機成分であり、石灰化の核となることが知られており、スポンジ状、ゲル状と様々な形態のものを作製することができる。しかしながら、コラーゲンタイプIの石灰化能は極めて低く、単独で象牙質再生を促すことはできない。

【0006】

【特許文献1】特開2003-235953号

【非特許文献1】Saito et al. Bone 21(4) 305-311 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、低廉かつ安全な象牙質再生方法とその他の材料を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明者らはフォスフォフォリン、フォスビチンまたはDMP-1(Dentin Matrix Protein-1)等の非コラーゲン製リン酸化蛋白質に石灰化能が認められることに着目した。そして、これらをコラーゲンに架橋した複合材料を足場として歯髄細胞を象牙芽細胞に分化させれば、優れた象牙質再生が期待できると考えた。

【0009】

すなわち、本発明は以下の(1)～(11)に関する。

- (1) 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髄細胞を培養することを特徴とする、象牙質の再生方法。
- (2) 前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質が、フォスフォフォリン、フォスビチンまたはDMP-1、あるいはそれらの混合物である、上記(1)記載の方法。
- (3) 前記非コラーゲン性リン酸化蛋白質がコラーゲンに化学架橋されていることを特徴とする、上記(1)または(2)に記載の方法。
- (4) 前記複合材料が、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料である、上記(1)または(2)に記載の方法。
- (5) 増殖因子を添加して培養を行うことを特徴とする、上記(1)～(4)のいずれか1に記載の方法。
- (6) 前記増殖因子が骨形成因子(BMP)である、上記(5)記載の方法。
- (7) 前記コラーゲンがコラーゲンタイプIである、上記(1)～(6)のいずれか1に記載の方法。
- (8) さらに、前記複合材料が、ハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP,  $\alpha$ -TCP, ポログリコール酸およびポリ乳酸から選ばれる少なくとも1以上を含む、上記(1)～(7)のいずれか1に記載の方法。
- (9) 上記(1)～(8)のいずれか1に記載の方法によって再生された象牙質を前記複合材料とともに含む、象牙質修復用材料。
- (10) 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋後、凍結乾燥あるいは加熱ゲル化して作製される、スポンジ状あるいはゲル状複合材料からなる象牙質修復用材料。
- (11) さらに歯髄細胞を含む、上記(10)記載の象牙質修復用材料。

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明によれば、欠損した象牙質の効果的な再生が可能となる。本発明の象牙質再生方法や象牙質修復用材料は、低廉かつ安全であるため、歯科医療一般における保存的治療手段として有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0011】

本発明は、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髄細胞を培養することを特徴とする、象牙質の再生方法に関する。以下、本発明の方法について詳述する。

##### 【0012】

#### 1. 非コラーゲン性リン酸化蛋白質

本発明で使用される「非コラーゲン性リン酸化蛋白質」は、石灰化能を有するコラーゲン以外のリン酸化蛋白質であって、例えば、フォスフォフォリン、フォスビチン、DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) 等が挙げられる。

##### 【0013】

#### (1) フォスフォフォリンの調製

フォスフォフォリンは、哺乳類の歯に含まれるリン酸化タンパク質で、単独で骨形成能を有することが知られている (Bone, 1997 Oct;21(4):305-11)。フォスフォフォリンは、市販のもの (和光純薬社製等) を用いてもよいが、例えば以下のようにして得ることができる。哺乳類 (例えば、ウシ等) の歯を抜歯し、軟組織、歯髄、エナメル質、セメント質を除去する。残った象牙質を細かく粉碎し、これを、蛋白質分解酵素を含む適当な緩衝液 (例えば、0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4) を用いて脱灰し、透析した後に凍結乾燥する。次に、得られた凍結乾燥物を緩衝液 (例えば20mM Tris-HCl, pH 7.4 [蛋白質

分解酵素含有)に溶解し、塩化カルシウムを添加する。生じた沈殿物を緩衝液(例えば、0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 [蛋白質分解酵素含有])に溶解し、透析後、再び凍結乾燥する。最後に、前記凍結乾燥物を尿素溶液(例えば、4M Urea, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0)に溶解後、イオン交換クロマトグラフィー(例えば、DEAE-Sephrose等)等により分離する。目的とするフォスフォオリンは、リン酸分析およびアミノ酸分析により同定することができる。

#### 【0014】

##### (2) フォスビチン

フォスビチンはフォスフォビチン(ホスビチンあるいはホスホビチン)ともいい、脊椎動物卵黄タンパク質の主成分で、卵黄顆粒に含まれるリン酸化蛋白質である。鶏卵フォスビチンは分子量約10万、約10%のリン酸を含み、アミノ酸の約半分がセリンでそのほとんどがホスホセリン残基になっている。フォスビチンについてもフォスフォオリン同様、単独で骨形成能を有することが知られている(Bone, 1997 Oct;21(4):305-11)。フォスビチンは、市販のもの(Sigma Chem. Co.)等を用いてもよいが、既報(Shainkin R, Perlmann GE., "Phosvitin, a phosphoglycoprotein. I. Isolation and characterization of a glycopeptide from phosvitin." J Biol Chem. 1971 Apr 10;246(7):2278-84.)に従い容易に調製することができる。

#### 【0015】

##### (3) DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1)

DMP-1は、歯の象牙質cDNA ライブラリーから同定された分泌性の非コラーゲン性酸性リン酸化蛋白質で、骨や象牙質などの細胞外マトリックスにおいてその石灰化に参与する(George

A. et al., J Biol Chem. 1993 Jun 15;268(17):12624-30.)。DMP-1遺伝子はヒト染色体では4q21に位置し、その近傍に位置するオステオポンチン、MEPE、骨シアロタンパク質遺伝子などとともにファミリーを形成する。DMP-1は、そのアミノ酸配列から組織中で負に荷電し、カルシウムイオンと結合するため、石灰化に深く関連すると考えられている。実際、DMP-1の骨芽細胞株への遺伝子導入実験では石灰化の促進が認められること(Feng JQ, et al., J Dent Res. 2003 Oct;82(10):776-80)や、DMP-1遺伝子の欠損が象牙質形成異常や低石灰化を伴う歯の形成阻害をもたらすこと(Ye L. et al. J Biol Chem. (2004) Feb 13 [Epub ahead of print])が報告されている。以上のとおり、DMP-1は骨や歯の石灰化(特に象牙質形成)に重要な分子であると考えられている。

#### 【0016】

本発明で用いられるDMP-1は、周知の方法(George A. et al., J Biol Chem. 1993 Jun 15;268(17):12624-30.)に従い、遺伝子工学的に生産したり、骨や歯の象牙質から抽出、精製することにより調製することができる。

#### 【0017】

##### 2. コラーゲン

本発明で用いられるコラーゲンとしては、骨や歯の有機質の大部分を占め、生体親和性が高いコラーゲンタイプIが好ましい。前記コラーゲンタイプIは、市販のものを用いても、公知の方法に従って調製してもよい。例えば、適当な材料(例えば、ウシ皮膚等の動物の結合組織)から、公知の方法に従ってコラーゲンを抽出・精製する。精製したコラーゲンは凍結乾燥後、酢酸溶液に溶解し、NaCl、NaOH、Hepes等を添加してインキュベートすることにより、再構成コラーゲンタイプI線維として得ることができる。

#### 【0018】

##### 3. 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンからなる複合材料

本発明にかかる複合材料は、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む。前記複合材料において、非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンの配合比(質量比)は、1:10~1:50であることが好ましく、1:20~1:40であることがより好ましい。また、複合材料総量(合計質量)に対し、非コラーゲン性リン酸化蛋白質は2~10質量%(以下、

単に「質量%」を%と記載する。)配合されることが好ましく、2.5~5.0%配合されることがより好ましい。非コラーゲン性リン酸化蛋白質の量が少なすぎると石灰化能が不十分となり、一方、非コラーゲン性リン酸化蛋白質の量が多すぎると複合材料のコストが高くなるからである。

#### 【0019】

前記複合材料において、非コラーゲン性リン酸化蛋白質はコラーゲン線維に化学架橋していることが好ましい。架橋剤としては、ジビニルスルホンまたは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミド等を用いることができる。

#### 【0020】

例えば、まずコラーゲン線維を炭酸カリウム、炭酸ナトリウム等の炭酸塩水溶液に溶かして室温でインキュベートする。該炭酸塩水溶液の濃度は、好ましくは0.1M~0.2M、より好ましくは0.4M~0.5Mである。これに、架橋剤、例えば、ジビニルスルホン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミド等を加え、予めコラーゲン繊維上に架橋鎖を導入する。添加する該架橋剤の量は、ジビニルスルホンであれば5.0質量%程度が好ましい。

#### 【0021】

次に、非コラーゲン性リン酸化蛋白質を添加してインキュベートし、コラーゲンと架橋させる。添加する非コラーゲン性リン酸化蛋白質の量は、コラーゲンに対して1/10~1/50が好ましく、1/20~1/40がより好ましい(質量比)。これを、蒸留水、続いて重炭酸塩(例えば、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等)溶液で洗浄し、余剰の非コラーゲン性リン酸化蛋白質や架橋剤を除去する。最後に、重炭酸ナトリウムとメルカプトエタノールを添加して架橋反応を止め、蒸留水でよく洗浄する。

#### 【0022】

架橋後の複合材料は、そのまま加熱してゲル化させゲル状構造物として用いてもよいし、凍結乾燥してスポンジ状構造物として用いてもよい。このゲル状あるいはスポンジ状の構造は、後述する歯髄細胞培養や歯の欠損部補填に適した特性を与える。

#### 【0023】

スポンジ状構造物を得る場合、凍結乾燥の条件(例えば、温度、凍結時間、水中での凍結乾燥等)は、所望の複合材料の構造、すなわち比表面積、空隙率、孔(空隙)の大きさ等に応じて、適宜調整することができる。また、得られた凍結乾燥物は、必要に応じて成形し、例えば後述する歯科用インプラント等として利用することができる。なお、「スポンジ状構造」とは、柔軟性を有する微小多孔質構造(数 $\mu\text{m}$ ~数10 $\mu\text{m}$ 程度の無数の孔(空隙)が存在する構造)を意味するものとする。本発明のスポンジ状構造を有する複合材料においては、その空隙率は好ましくは40~90%、より好ましくは60~90%である。この範囲を超えると、細胞の侵入が不十分となり石灰化能が低下するとともに、複合材料自体の強度が低下するからである。

#### 【0024】

前記スポンジ状構造を有する複合材料は、必須の成分である非コラーゲン性リン酸化蛋白質およびコラーゲンに加えて、本発明の目的・効果を損なわない範囲で、さらにハイドロキシアパタイト、 $\beta$  TCP、 $\alpha$  TCP、ポリグリコール酸およびポリ乳酸等の多孔質の硬材料を含んでいてもよい。

#### 【0025】

### 4. 象牙質の再生

本発明の複合材料を足場として歯髄細胞を播種して、適当な条件下で培養すれば、効果的に歯髄細胞を象牙質芽細胞に分化させることができる。歯髄細胞としては、患者自身から単離された歯髄細胞を好適に用いることができる。

#### 【0026】

細胞の播種は、足場である複合材料に単に播種するだけでもよいし、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、コラーゲン溶液等の液体とともに混合して播種してもよい。また、材料によって、細胞が複合材料の孔にスムーズに入らない場合は、引圧条件下で播



種してもよい。播種する細胞の数（播種密度）は象牙質再生をより効率よく行わせるため、適宜調整することが望ましい。

#### 【0027】

細胞培養に用いられる培地としては、MEM培地、 $\alpha$ -MEM培地、DMEM培地等、公知の培地を細胞に合わせて適宜選んで用いることができる。また、該培地には、FBS（Sigma社製）、Antibiotic-Antimycotic（GIBCO BRL社製）等の抗生物質や抗菌剤、増殖因子、転写因子等を添加しても良い。特に石灰化を促進させる増殖因子である骨形成蛋白質（BMP）を添加することが好ましい。培養は、通常3~10%CO<sub>2</sub>、30~40℃、特に5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で行われるが、これに限定されるものではない。培養期間は、少なくとも3日以上行うことが望ましいが、これに限定されるものではなく、状況に応じて適宜決定される。

#### 【0028】

こうして歯髓細胞から分化誘導された象牙質芽細胞は、さらに増殖させ、足場である複合材料とともに、欠損部に埋入あるいは注入することで、歯の象牙質を効果的に再生することができる。

#### 【0029】

### 5. 象牙質修復用複合材料（歯科用インプラント）

本発明により得られる複合材料は、水を吸うとスポンジのような弾性を有し、優れた生体親和性、石灰化能を有する。また、成形が容易で、しなやかな力学的特性を有するため、歯の欠損部のような小さな隙間を適切に充填することができる。すなわち、本発明の複合材料を歯の欠損部に埋入すると、速やかに周囲組織と結合し、ドナー側組織と複合材料との界面は完全に一体化しうる。したがって、本発明の複合材料は、それ自体、歯の象牙質欠損部を修復・再生させるためのインプラントとして利用できる。

#### 【0030】

インプラントとして利用する場合、複合材料は、スポンジ状構造物であっても、ゲル状構造物であってもよい。スポンジの形状やゲルの硬度は補填すべき欠損部や操作性に合わせて自由に調整できる。さらに、複合材料には他の生理活性物質や薬剤等を含浸させて使用することもできる。例えば、抗炎症剤を含浸させて徐放させれば、歯髓欠損部の術後炎症を効果的に防止することができる。

#### 【0031】

前記象牙質修復用インプラントは、複合材料中に歯髓細胞を播種し、これをin vitroで象牙質芽細胞に分化・増殖させてから、足場である複合材料とともに、欠損部に埋入するものであってもよい。歯髓細胞として、患者由来の細胞を用いれば、それはより理想的な象牙質修復用インプラントとなる。

#### 【実施例】

#### 【0032】

以下、参考例および試験例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0033】

〔参考例〕 フォスフォフォリン/コラーゲン複合材料の製造

#### (1) フォスフォフォリンの精製

まず、ウシ顎骨から永久歯を抜歯し、軟組織、歯髓、エナメル質、セメント質を除去する。残った象牙質を液体窒素下にて200メッシュ以下の細粒子に粉碎する。象牙質粉を0.5 M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 [蛋白質分解酵素: 100mM 6-aminohexanoic acid (和光純薬社製), 5mM benzamidine-HCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有] で4℃にて脱灰する。

#### 【0034】

つぎに、EDTA脱灰液を、4℃にて脱イオン蒸留水に対し、透析膜(SPECTRUM MWCO 3500, 132725)を用いて透析して、凍結乾燥（東京理科機械製: EYELA FREEZ DRYER 90500042）する。EDTA抽出物は20mM Tris-HCl, pH 7.4（蛋白質分解酵素 含有）に溶解し、最終濃度

が1MになるようにCaCl<sub>2</sub>を添加する。沈殿物を遠心分離（日立工機製：HIMAC CENTRIFUGE3 45043）により回収し、再び0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4（蛋白質分解酵素を含有）に溶解し、脱イオン蒸留水に対して透析して、凍結乾燥する。凍結乾燥物を4M Urea, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0に溶解してDEAE-Sephrose(Sigma Chem. Co. 製) Column Chromatographyにて、0-1M NaCl直線勾配により溶出させる。

最後に、リン酸分析およびアミノ酸分析によりフォスフォフォリンを同定する。

#### 【0035】

##### (2) コラーゲンタイプ I の精製

ウシ皮膚を細切し、4℃にて蒸留水、20% NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4にて洗浄する。次に、1M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4にてovernightで抽出し、遠心分離により上清を回収し、0.5M 酢酸、1M NaClを加えovernightで攪拌する。

#### 【0036】

遠心分離により残渣を回収し、0.5M 酢酸に溶かして、さらに遠心分離を行う。上清を5M NaOH, 4.4M NaClで中和し、overnightで攪拌し、遠心分離する。この残渣に4.4M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4を添加しovernightで攪拌し、遠心分離する。

#### 【0037】

残渣に2.4M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4を添加しovernightで攪拌し、遠心分離する。残渣に1.7M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4を添加しovernightで攪拌し、遠心分離する。得られた上清を0.1M 酢酸に対して透析し、凍結乾燥する。

#### 【0038】

凍結乾燥したコラーゲンと50mM 酢酸を用いて、0.3%コラーゲン酢酸溶液を作成する。0.15M NaClに続き、0.6N NaOH, 0.1M Hepes（和光純薬社製）を添加して37℃にてインキュベートすることにより、再構成コラーゲンタイプ I 線維が得られる。

#### 【0039】

##### (3) フォスフォフォリンのコラーゲンへの架橋結合

(2)で得られたコラーゲン線維を0.5M 炭酸ナトリウムで室温にてovernightでインキュベートする。さらにジビニルスルホン(Sigma Chem. Co. 製)を添加し、2時間インキュベートする。0.5M 炭酸ナトリウムでコラーゲン線維をよく洗浄後、フォスフォフォリンを添加し、overnightでインキュベートして架橋させる。これを蒸留水で洗い、さらに0.5M 重炭酸ナトリウムでよく洗浄して、過剰なフォスフォフォリンとジビニルスルホンを除去する。

#### 【0040】

次いで、0.5M 重炭酸ナトリウムとメルカプトエタノールを添加し、overnightでインキュベートして架橋反応を止める。得られた複合体は蒸留水で洗い、さらに0.5M NaCl, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4および蒸留水で洗浄する。これを凍結乾燥し、コラーゲン-フォス

フォフォリン複合体（スポンジ状シート）を作製した。また、フォスフォオリンを加えないコラーゲン線維のみを、蒸留水でよく洗った後、凍結乾燥し、フォスフォフォリンを含まないコラーゲン複合体（スポンジ状シート）を作製した。

#### 【0041】

〔試験例〕 ビーグル犬による象牙質再生試験

##### 1. 試料覆髄

以下のプロトコルにて、実験的に作製した歯髄欠損部を参考例1で作製したphosphopolyn-collagen複合体で補填し、象牙質再生効果を確認する。

- 1) 硫酸アトロピン 2 ml筋注
- 2) ホリゾン（ジアゼパム製剤） 4 ml筋注
- 3) ケタラル（塩酸ケタミン） 10 ml筋注
- 4) 静脈確保のため脚をバリカンにて剃毛
- 5) 翼状針にて静脈路を確保し固定
- 6) ラボナール（チオペンタールナトリウム） 2-3 mlを投与

(術中は覚醒し始めたら1-2 mlを投与する)

- 7) ポタコール (ビクシリン250 mg含有) (電解液) を術中点滴  
もしくは生食水にビクシリン (アンピシリンナトリウム) を投与し点滴
- 8) 2%キシロカイン (塩酸リドカインエピネフリン含有) にて実験歯部位に局所麻酔を施す。
- 9) 窩洞形成  
実験歯  
上顎：切歯2,3番、犬歯、小臼歯2,3番  
下顎：切歯3番、犬歯、小臼歯2,3番  
実験歯に、エアータービンダイヤモンドポイントにて直径2-3 mm程度の窩洞を形成する。  
また、生食水注水下で、2 mmのスチールラウンドバーにて1 mm程度の露髄面を形成する。
- 10) 洗浄および止血。
- 11) 各試料(phosphopolyn-collagen複合体、およびコントロールとしてcollagen)を窩洞面に置く。
- 12) グラスアイオノマーセメントにて仮封。
- 13) さらにコンポジットレジンにて修復。
- 14) 炎症防止のためボルタレン座薬 (ジクロフェナクナトリウム) を投与してオペを終了。

#### 【0 0 4 2】

##### 2. 試料摘出

- 1) 試料覆髄時と同様の方法で静脈確保まで行う。
- 2) 三倍量のラボナール (チオペンタールナトリウム) にて麻酔死させる。
- 3) 実験歯をヘーベル、鉗子にて抜去後直ちに中性ホルマリン溶液にて固定する。

#### 【0 0 4 3】

##### 3. 評価

光学顕微鏡にて組織学的観察を行い、さらに象牙質の形態計測を行うことにより、象牙質再生効果を評価する。

#### 【0 0 4 4】

上記参考例および試験例はphosphopolyn-collagen複合体についての実験プロトコールであるが、同様にして、phosvitin-collagen複合体、DMP-1-collagen複合体を作製し、象牙質再生効果を確認することができる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0 0 4 5】

本発明の象牙質再生方法や象牙質修復用材料は、低廉かつ安全であるため、高額医療に限定されない、歯科医療一般における保存的治療手段として利用できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低廉かつ安全な象牙質再生方法とそのための材料を提供すること。

【解決手段】 非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを含む複合材料を足場として歯髓細胞を培養することを特徴とする象牙質の再生方法、および非コラーゲン性リン酸化蛋白質とコラーゲンを、ジビニルスルホンまたは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジアミドを用いて架橋後、凍結乾燥あるいは加熱ゲル化して作製される象牙質修復用材料。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 4 5 6 5 8
受付番号	5 0 4 0 0 2 8 2 0 0 0
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 2 月 2 4 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 2月23日
-------	-------------

特願 2 0 0 4 - 0 4 5 6 5 8

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所